

文章编号 1006-8147(2014)01-0008-03

论 著

炎症因子 IL-23 对黑色素瘤 B16F10 细胞增殖和侵袭能力的影响

田 原¹, 马跃美¹, 刘艳荣², 房东亮¹, 赵秀兰²

(天津医科大学 1. 外科手术学教研室; 2. 病理学教研室, 天津 300070)

摘要 目的: 探讨白细胞介素-23(IL-23)对黑色素瘤 B16F10 细胞增殖和侵袭能力的影响。方法: 体外培养小鼠黑色素瘤 B16F10 细胞, 采用 MTT 法检测 IL-23 对 B16 细胞增殖能力的影响; Transwell 侵袭实验检测 IL-23 对 B16 细胞侵袭能力的影响; 明胶酶谱法分析 IL-23 处理后肿瘤细胞 B16 细胞分泌 MMP-2 和 MMP-9 的活性表达情况。免疫印迹杂交法检测 IL-23 处理组肿瘤细胞核转录因子 κ B P65(NF- κ B P65)的表达水平。结果: 与对照组相比, IL-23 处理组 B16F10 细胞穿膜数明显增多 ($P<0.01$); 肿瘤细胞 MMP-2 和 MMP-9 的表达活性增强 ($P<0.01$); 核转录因子 NF- κ B P65 的表达水平显著提高 ($P<0.01$); B16 细胞的增殖能力未见明显变化 ($P>0.05$)。结论: IL-23 对黑色素瘤 B16F10 细胞的增殖能力无影响, 可通过上调 MMP-2 和 MMP-9 的活性促进肿瘤细胞侵袭, 其分子机制可能与 NF- κ B 信号通路的激活相关。

关键词 IL-23; B16 细胞; 黑色素瘤; 基质金属蛋白酶; 侵袭; NF- κ B; 小鼠

中图分类号 R730.23+R739.5

文献标志码 A

Effects of IL-23 on proliferation and invasion of B16 melanoma cells

TIAN Yuan¹, MA Yue-mei¹, LIU Yan-rong², FANG Dong-liang¹, ZHAO Xiu-lan²

(1. Department of Operative Surgery; 2. Department of Pathology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract **Objective:** To investigate the effects of interleukin-23 (IL-23) on the proliferation and invasion of mouse B16F10 melanoma cells. **Methods:** Mouse B16 melanoma cells were cultured *in vitro*. Cells in research were treated with and without a certain-concentration IL-23 respectively. The proliferation of B16 cells was determined by MTT. And the invasion of B16 cells was detected by Transwell experiment. The expression activities of MMP-2 and MMP-9 were analyzed by Gelatin Zymography and NF- κ B phosphorylated P65 expression was measured by Western blot. **Results:** The growth rate of B16 cells treated with IL-23 did not show significant change ($P>0.05$) compared with the control group. Matrigel invasion assay revealed that addition of IL-23 to B16 cells significantly enhanced its invasive properties ($P<0.01$), and Gelatin Zymography analysis showed that the MMP-9 activity of B16F10 cells was significantly increased by IL-23 ($P<0.01$). IL-23 induced an increased NF- κ B phosphorylated P65 expression in B16 cells. **Conclusion:** IL-23 brings no effect on proliferation of B16F10 cells but can promote invasion which is associated with the increased MMP-9 activities, and this process is correlated with NF- κ B signal pathway activation.

Key words IL-23; melanoma B16 cells; matrix metalloproteinase; invasion; NF- κ B; mice

白细胞介素-23(IL-23)在炎症和自身免疫性疾病中具有重要的调节作用, 目前研究表明 IL-23 可通过调控肿瘤微环境中的炎症反应^[1], 从而促进肿瘤的发生与侵袭迁移^[2]。有关炎症因子 IL-23 对黑色素瘤细胞增殖和侵袭力的直接影响少见报道。本研究在前期研究慢性炎症与肿瘤关系的基础上, 通过体外实验探讨 IL-23 对黑色素瘤 B16 细胞增殖和侵袭能力的影响, 为进一步研究 IL-23 在慢性

炎症与肿瘤发生发展中所发挥的作用提供一定理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 小鼠黑色素瘤细胞株 B16F10 由天津医科大学病理学教研室冻存。重组鼠 IL-23 购自美国 PeproTech 公司, Transwell 小室(直径为 8 μ m)购自 Invitrogen 公司, MTT 购自美国 Sigma 公司, Matrigel 胶购自美国 BD 公司, 细胞培养板购自美国 Costar 公司, 胎牛血清(FBS)购自美国 Hyclone 公司。兔抗鼠 NF- κ B 磷酸化 P65 一抗购自美国 Santa Cruze 公司, 兔抗鼠 β -actin 一抗、山羊抗兔二抗购自北京中

基金项目 天津市自然科学基金资助项目(10JCZDJC20400)

作者简介 田原(1987-), 男, 硕士在读, 研究方向: 慢性炎症与肿瘤生成; 通信作者: 马跃美, E-mail: mindyma@126.com。

杉金桥生物公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 小鼠黑色素瘤细胞 B16F10,接种于含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中(加入青霉素、链霉素各 100 U/mL),置于 37 ℃、5%CO₂ 培养箱中培养,以 0.25%胰蛋白酶消化传代。所有实验均用对数生长期的细胞。

1.2.2 MTT 法检测 B16 细胞的增殖能力 将 B16 细胞制备成 1×10⁴/mL 单细胞悬液,按每孔 200 μL 接种于 96 孔培养板,培养 24 h 后在培养液中加入终浓度为 10 ng/mL 的 IL-23,并设空白对照组,在培养箱中分别放置 24、48、72、96 h 后,加入 MTT 100 μL 培养 4 h,吸弃液体,每孔加入 100 μL DMSO 充分溶解 15 min。用酶标仪于 490 nm 处测吸光度值(A 值),结果为 5 复孔的平均值。

1.2.3 Transwell 侵袭实验检测 B16 细胞的侵袭能力 用 50 mg/L Matrigel 胶 1:8 稀释液包被 Transwell 小室的上室面,37 ℃孵育过夜。实验前细胞用无血清培养基培养过夜,次日消化重悬细胞,于下室加入含 10%胎牛血清的培养基、上室中加入无血清和浓度为 10 ng/mL IL-23 的 B16 细胞悬液各 200 μL,并设空白对照组,在培养箱中培养 48 h 后取出小室,PBS 淋洗,擦去上室中细胞,95%酒精固定 10 min,4 g/L 结晶紫染色,PBS 清洗,200 倍倒置显微镜下拍照穿膜细胞,随机选 10 个视野,计算平均数。实验重复 3 次,每组各设 3 复孔。

1.2.4 明胶酶谱检测 B16 细胞 MMP-2 和 MMP-9 的表达活性 将无血清的 B16 细胞接种到 24 孔板,每孔 500 μL,培养 24 h 后,在培养液中加入 10 ng/mL IL-23,培养 48 h 后,收集上清液,12 000 r/min,离心 10 min,进一步取上清液进行明胶酶谱检测。以含 0.1%明胶的 10%聚丙烯酰胺凝胶进行电泳至溴酚兰进入阳极缓冲液为止,分离凝胶,2.5% Triton-X100 洗胶 4 次,每次 30 min。将胶完全浸入明胶酶孵育液(50 mmol/L pH7.5Tris-HCl、10 mmol/L CaCl₂、200 mol/L NaCl、1 μmol/L ZnCl₂)中,37 ℃孵育 42 h,常规考马斯亮蓝染色,脱色液脱色至复染带清晰,图像分析系统测定凝胶中 MMPs 活性条带活性水平,应用 Gel-pro analyzer 分析软件测定条带平均灰度值。

1.2.5 Western blot 检测 加入细胞裂解液裂解细胞,提取细胞总蛋白,加样行 10%聚丙烯酰胺凝胶电泳。将蛋白从 SDS-PAGE 胶转膜至 PVDF 膜,利用 5%脱脂奶粉封闭,然后分别加入兔抗鼠 NF-κB 磷酸化 P65 一抗(1:200)、β-actin 一抗(1:200),在

37 ℃下作用 2 h;用 TBST 漂洗 3 次,每次 10 min 后与山羊抗兔 IgG 抗体(1:2 000)反应,37 ℃作用 2 h;然后用 TBST 漂洗,10 min/次,洗涤 3 次;在暗室避光 X 光胶片曝光,进行显影、定影、拍照。

1.3 统计学处理 实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 17.0 软件做统计分析,两独立样本比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IL-23 对 B16 细胞增殖能力的影响 MTT 法检测结果显示,10 ng/mL IL-23 作用于 B16 细胞 24、48、72 和 96 h 时,实验组与对照组相比,细胞活力均无显著变化,IL-23 对细胞的增殖无影响,差异无统计学意义($P > 0.05$)(图 1)。

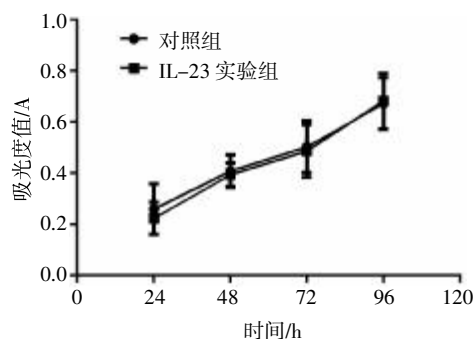


图1 IL-23对B16细胞增殖能力的影响

Fig 1 The effect of IL-23 on proliferation ability of B16 cells

2.2 IL-23 对 B16 细胞侵袭能力的影响 Transwell 侵袭实验显示,10 ng/mL IL-23 作用于 B16 细胞 24 h 后,与对照组相比,穿过基底膜的数目明显增多,差异有统计学意义($P < 0.01$)(表 1)。

表1 IL-23对B16细胞侵袭能力的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Effect of IL-23 on invasion ability of B16 cells($\bar{x} \pm s$)

组别	n	穿膜细胞数
对照组	9	15.33±1.25
IL-23 处理组	9	26.78±1.34**
t		6.80

与对照组相比,** $P < 0.01$

2.3 IL-23 对 B16 细胞 MMP-2 和 MMP-9 表达活性的影响 与对照组相比,10 ng/mL IL-23 作用于 B16 细胞 48 h 后,可明显增强肿瘤细胞 MMP-9 活性,差异有统计学意义($P < 0.01$),MMP-2 活性未见显著变化($P > 0.05$)(图 2)。

2.4 IL-23 对 B16 细胞磷酸化 NF-κB P65 表达水平的影响 Western blot 结果与对照组相比,IL-23 处理组肿瘤细胞磷酸化 P65 蛋白表达水平显著升高($P < 0.01$),见图 3。

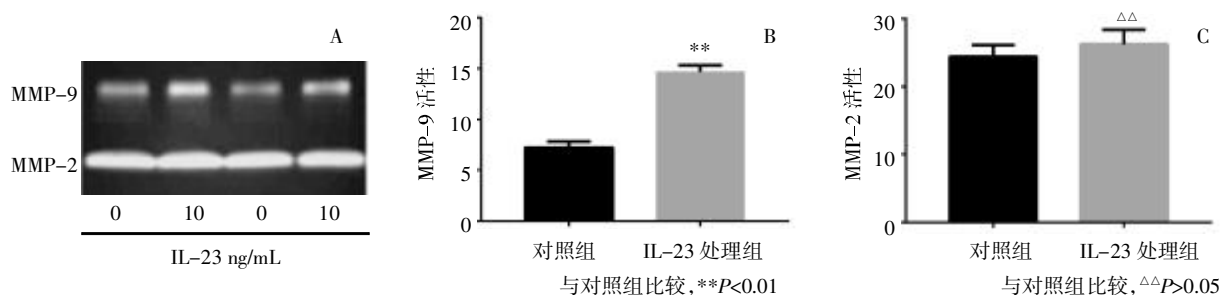


图 2 IL-23 对 B16 细胞 MMP-9 和 MMP-2 表达活性的影响

Fig 2 Effects of IL-23 on MMP-9 and MMP-2 expression activities of B16 cells

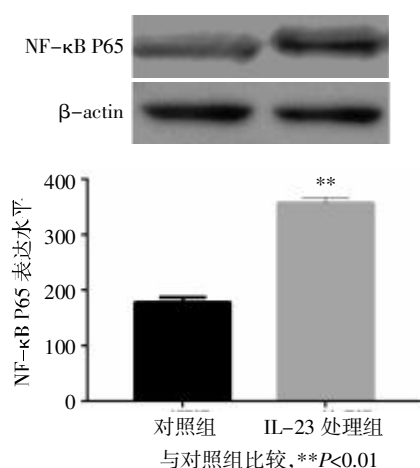


图 3 IL-23 处理组肿瘤细胞磷酸化 P65 蛋白的表达

Fig 3 The expression of phosphorylated P65 in IL-23 treated B16 cells

3 讨论

慢性炎症在多种肿瘤的启动、进展及转移潜能中起着致病因子作用,炎症性细胞因子的异常表达,可以在体内募集单核巨噬细胞、中性粒细胞等到达肿瘤临近的部位,形成有利于肿瘤生长和侵袭的微环境,诱导肿瘤血管生成促进肿瘤发展进程。IL-23 是近年来发现的一种同时参与慢性炎症形成和肿瘤发生的细胞因子,研究表明 IL-23 可促进局部环境中炎症介质的释放,抑制机体特异性免疫监视,促进黑色素瘤的发生与生长^[3];IL-23 可激活 Stat3 信号通路,在肺癌细胞的增殖过程中发挥重要作用,并呈现其浓度依赖性^[4];IL-23 也可在肝癌的发展过程中激活 NF-κB 信号通路加速其转移和侵袭^[5]。因此针对 IL-23 与肿瘤细胞关系的研究对肿瘤的防治、免疫应答及调节都有重要意义。

Langowski^[3]发现 IL-23p19 缺失的小鼠能够抵抗肿瘤发生,同时阻断 IL-23 信号通路也能抑制肿瘤生长。本文前期建立荷瘤小鼠-慢性炎症复合模型^[6]研究中,进一步证实了 IL-23 对肿瘤的生长具有调节作用。最近研究表明低浓度外源性 IL-23 可直接促进肺癌肿瘤细胞的增殖,并参与肿瘤微环境

的形成;高浓度 IL-23 则抑制肿瘤细胞增殖^[4]。而本实验体外 IL-23 刺激 B16 细胞,肿瘤细胞增殖活性却未见明显提升,提示 IL-23 在不同肿瘤疾病中作用机制可能存在差异,不同 IL-23 浓度下肿瘤细胞的增殖效应也不尽相同。综合前期体内模型结果^[6],实验组血清检测 IL-23 表达升高的同时,移植瘤微血管密度(MVD)等指标显著增加,本文推测在黑色素瘤发生发展的过程中,IL-23 可能通过诱导黑色素瘤细胞或基质细胞分泌 MMPs、VEGF 等介质,促进肿瘤血管生成进而促进肿瘤生长。

IL-23 促进肿瘤微环境中 Th0 细胞分化为 Th17 细胞,Th17 细胞产生 IL-17A,IL-17A 可以通过 NF-κB 上调基质金属蛋白酶的表达来促进肝癌细胞的侵袭和迁移^[7],但 IL-23 对肿瘤的侵袭是否有直接的作用少见报道。本文侵袭实验结果显示,IL-23 处理后 B16 细胞穿膜细胞数明显增多,上述增殖实验提示穿膜数的增加并非由增殖引起,说明 IL-23 促进了 B16 细胞的体外侵袭。MMPs 是一类与肿瘤侵袭相关的锌依赖性肽链内切酶家族,其相关的信号传导通路参与了肿瘤细胞的生长、肿瘤侵袭及肿瘤血管的形成^[8],目前发现的 MMPs 有 23 种,MMP-2、MMP-9 等与肿瘤的侵袭和迁移相关,本文明胶酶谱分析 IL-23 处理 B16 细胞的 MMP-9 活性明显增强,说明 IL-23 可通过上调 MMP-9 的活性促进 B16 细胞的侵袭。Western blot 分析显示 IL-23 促进了磷酸化 P65 的表达,从而激活 NF-κB 信号通路,说明 NF-κB 是 MMP-9 表达的关键转录因子,印证了 NF-κB 通路是炎症与肿瘤相联系的关键点^[9],NF-κB 信号通路的活化参与了恶性肿瘤发生发展的多个环节^[10]。

综上所述,IL-23 对黑色素瘤 B16 细胞的增殖无明显的刺激作用,可通过提高 MMP-9 的活性而增强细胞的体外侵袭能力,这一促进作用与肿瘤细胞 NF-κB 信号通路的上调有关。本文研究 IL-23 在

(下转第 13 页)

3 讨论

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一。DDP 在乳腺癌的化疗中发挥着重要的作用,但乳腺癌细胞对 DDP 的耐药、化疗的毒副反应,成为 DDP 在临床上治疗乳腺癌的限制。因此,在乳腺癌的化疗中,大家期待对肿瘤细胞敏感、化疗反应小的化疗药物。PN 是从艾菊中提取出来的倍半萜内酯,近年来,其在抗肿瘤作用的机制得到广泛研究。此外,PN 可以增强肿瘤细胞对化疗药物的敏感性,如肝癌、结肠癌等^[2-3]。但 PN 对乳腺癌细胞影响的研究较少。

笔者的研究结果表明,PN 和 DDP 单独及联合作用于乳腺癌细胞株 BT549 均可引起细胞凋亡,且具有浓度-剂量依赖性。当两种药物联合使用时,对细胞的抑制作用明显增强。近年来研究发现,PN 通过多种作用机制发挥抗肿瘤作用,主要有调节 P21 使细胞周期阻滞在 G1/S 期^[4-5],调节 Bcl 家族^[6]及抑制 NF- κ B^[7]等信号通路促进细胞凋亡。研究表明,DDP 抗肿瘤作用机制主要是通过促进细胞周期阻滞和导致细胞凋亡实现的^[8]。这主要是由于细胞蛋白 P53 和 P73 呈现 DDP 对 DNA 损伤的反应,从而引起细胞周期阻滞或细胞凋亡。这种反应可诱导两种平行的死亡反应通路,即依赖 P53 和依赖 P73 两条通路。此外 Bcl 家族蛋白也是促进 DDP 诱导细胞凋亡的机制之一^[9]。

本研究同样证实了 PN 和 DDP 都使细胞周期阻滞在 G1/S 期,从而协同达到抑制细胞增殖的作

用。此外两种药物可能通过调节 Bcl 家族达到抗肿瘤作用,这有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] Kishida Y, Yoshikawa H, Myoui A. Parthenolide, a natural inhibitor of Nuclear Factor- κ B, inhibits lung colonization of murine osteosarcoma cells[J]. Clin Cancer Res, 2007, 13 (1): 59
- [2] 王秀英,冷水龙.小白菊内酯增强肝癌细胞对顺铂敏感性的实验研究[J].实用医学杂志,2011(272): 177
- [3] 余南荣,李昌宾,纪术峰,等.小白菊内酯及顺铂对人结肠癌细胞 SW620 凋亡和增殖的作用[J].肿瘤学杂志,2013,19(4): 277
- [4] Gopal Y N, Arora T S, Van Dyke M W. Parthenolide specifically depletes histone deacetylase 1 protein and induces cell death through ataxia telangiectasia mutated[J]. Chem Biol, 2007, 14 (7): 813
- [5] Kim J H, Liu L, Lee S O, et al. Susceptibility of cholangiocarcinoma cells to parthenolide-induced apoptosis[J]. Cancer Res, 2005, 65 (14): 6312
- [6] Pajak B, Gajkowska B, Orzechowski A. Molecular basis of parthenolide-dependent proapoptotic activity in cancer cells[J]. Folia Histochem Cytobiol, 2008, 46 (2): 129
- [7] Zhang D, Qiu L, Jin X, et al. Nuclear factor- κ B inhibition by parthenolide potentiates the efficacy of Taxol in non-small cell lung cancer in vitro and in vivo[J]. Mol Cancer Res, 2009, 7 (7): 1139
- [8] Allday M J, Inman G J, Crawford D H, et al. DNA damage in human B cells can induce apoptosis, proceeding from G1/S when p53 is transactivation competent and G2/M when it is transactivation defective[J]. EMBO J, 1995, 14 (20): 4994
- [9] Levy D T, Ross H, Powell L, et al. The role of public policies in reducing smoking prevalence and deaths caused by smoking in Arizona: results from the Arizona tobacco policy simulation model[J]. J Public Health Manag Pract, 2007, 13 (1): 59

(2013-09-13 收稿)

(上接第 10 页)

慢性炎症与肿瘤进展中的调节作用,并为以 IL-23 作为新的生物治疗靶点应用于临床提供了一定的实验依据。

参考文献:

- [1] Kortylewski M, Xin H, Kujawski M, et al. Regulation of the IL-23 and IL-12 balance by Stat3 signaling in the tumor microenvironment[J]. Cancer Cell, 2009, 15(2): 114
- [2] Teng M W, von Scheidt B, Duret H, et al. Anti-IL-23 monoclonal antibody synergizes in combination with targeted therapies or IL-2 to suppress tumor growth and metastases[J]. Cancer Res, 2011, 71(6): 2077
- [3] Langowski J L, Zhang X, Wu L, et al. IL-23 promotes tumour incidence and growth[J]. Nature, 2006, 442(7101): 461
- [4] Li J, Zhang L, Zhang J, et al. Interleukin 23 regulates proliferation of lung cancer cells in a concentration-dependent way in association with the interleukin-23 receptor[J]. Carcinogenesis, 2013, 34(3): 658

- [5] Li J, Lau G, Chen L, et al. Interleukin 23 promotes hepatocellular carcinoma metastasis via NF- κ B induced matrix metalloproteinase 9 expression[J]. PLoS One, 2012, 7(9): e46264
- [6] 房东亮,马跃美,赵秀兰,等.慢性炎症对小鼠黑色素瘤血管生成的影响[J].天津医药,2013,3:230
- [7] Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment[J]. Cell, 2010, 141(1): 52
- [8] Li J, Lau G K, Chen L, et al. Interleukin 17A promotes hepatocellular carcinoma metastasis via NF- κ B induced matrix metalloproteinases 2 and 9 expression[J]. PLoS One, 2011, 6(7): e21816
- [9] Colotta F, Allavena P, Sica A, et al. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability[J]. Carcinogenesis, 2009, 30(7): 1073
- [10] Grivennikov S I, Karin M. Dangerous liaisons: STAT3 and NF- κ B collaboration and crosstalk in cancer[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2010, 21(1): 11

(2013-10-15 收稿)